

# Arkivpatologi – nye perspektiver på lagret vevsmateriale

## Sammendrag

**Bakgrunn.** Under navnet biobanker er systematiserte samlinger av humant biologisk materiale blitt et område med stort potensial for behandling, diagnostikk og forskning.

**Materiale og metode.** En oversikt over bruk av arkivmateriale i patologien blir gitt, sammen med en gjennomgang av moderne forskningsteknikker som kan anvendes ved studier av slikt materiale fra 1930-årene og frem til i dag.

**Resultater.** I norske patologiarbiver oppbevares 20 millioner parafininnstøpte vevsprøver og like mange cytologiske preparater. Samlet representerer dette 10 millioner pasienter over et tidsrom på mer enn 70 år. Et bredt spekter av moderne immunologiske, celle- og molekylærbiologiske metoder og ulike former for ny teknologi kan anvendes i vitenskapelige studier av dette materialet.

**Fortolkning.** Patologilaboratoriens celle- og vevsarkiver representerer et betydelig potensial for fremtidig utviklingsarbeid og medisinsk forskning.

**Ole Didrik Lærum**  
*ole.laerum@gades.uib.no*

**Solrun Steine**  
**Kalaiarasy Kugarajh**  
**May Britt Kalvenes**  
**Bjørn Bertelsen**

Avdeling for Patologi  
Gades Institutt  
Haukeland Universitetssykehus  
5021 Bergen

Utviklingen av moderne celle- og molekylærbiologi tvinger frem et endret kroppsbilde (fig 1). DNA-molekylet fremstår i økende grad som en nøkkel til hvem vi er. Informasjon om våre fysiske og mentale anlegg og utsikter til helse og sykdom ligger for en stor del lagret i arvestoffet. Celler og vev som avgis, for eksempel i flass, hår, urin, avføring og svette, inneholder denne informasjonen.

## Biobanker

Mange personer har gjennom tidene avgitt celler og vev, og dermed DNA, til en eller flere biobanker (1). Dette er systematiske samlinger av humant biologisk materiale (fig 2). Biobankene kan klassifiseres i henhold til anvendelsen av det oppbevarte materialet. Diagnostiske banker omfatter produkter som har vært brukt til å stille diagnoser, for eksempel patologilaboratoriens vevs- og cellearkiver, mens behandlingsbiobanker

er samlinger av celler eller vev til bruk i medisinsk behandling – nedfrosne befruktete eggceller samt blodbanker kan tjene som eksempel. Forskningsbiobanker inneholder humant biologisk materiale som anvendes i medisinsk forsknings- og utviklingsarbeid. I dag er det økende interesse for å samle humant biologisk materiale til kommersiell bruk, blant annet til utvikling av nye legemidler og diagnostiske produkter. Antallet slike kommersielle biobanker vokser hurtig, særlig i USA og Europa.

## Arkeologi, antropologi og patologi

Med raffinerte metoder er det i økende grad blitt mulig å stille diagnoser på rester av mennesker funnet ved arkeologiske utgravninger (2). Det mest dramatiske tilfellet var det godt bevarte liket av en ung jeger som ble funnet i isen i høyfjellene i grenseområdet mellom Østerrike og Italia for noen år siden. Det viste seg at mannen var over 6 000 år gammel. Han ble ikke bare gjenstand for omhyggelig forskning – men det kom også frem at han trolig var blitt myrdet (3). Sammensetningen av hans siste måltid er til og med blitt klarlagt (4). I 1997 klarte en forskergruppe å analysere nærmere 100 000 år gammelt DNA fra neandertalere (5). Denne og andre studier kaster nytt lys over utviklingen av det moderne menneske.

Utgravninger av kirkegårder har gitt muligheter til å undersøke sykdomsforhold i historisk tid (6). Kombinert med molekylær-

Figur 1

Kroppsbildet i endring

### Utsondringer

Svette  
Spytt  
Urin  
Avføring  
Hår  
Talg, flass  
Sæd

### Prøver

Blod  
Serum  
Celler  
Vev

### Nye metoder gjør at

- materialet kan oppbevares (biobank)
- DNA, RNA og protein kan ekstraheres
- analyser kan gjøres på genomet, på genespresjon og protein som gir komplementære data
- biokjemiske og cellulære analyser kan utføres
- data kan analyseres og brukes til å rekonstruere gener og identifisere multiple genegenskaper
- eksperimenter kan gjøres på levende celler og på isolert DNA
- celler kan dyrkes opp og nyttes terapeutisk

Dette får etiske konsekvenser, både for behandling og forskning

DNA-molekylet fremstår som en nøkkel til hvem vi er. Kroppsbildet vårt endres fordi alle celler vi avgir inneholder denne nøkkelen

Engelsk resymé finnes i artikkelen på [www.tidsskriftet.no](http://www.tidsskriftet.no)

**Figur 2**

Former for materiale i biobanker

**Levende celler og vev**

- Celle- og vevskultur
- Nedfryste vevsbiter -130 - -196 °C

Materialet kan *både* brukes til analyse og eksperimenter

**Døde celler og vev**

- Nedfryste
- Fikserte - snitt og utstryk
- parafinblokker

Materialet kan brukes til analyser og isolering av cellekomponenter

**Celleprodukter**

- DNA
- RNA
- Protein

Materialet kan brukes til analyse og eksperimenter

*Biobanker er systematiske samlinger av ulike typer humant biologisk materiale*

biologiske undersøkelser og avanserte biokjemiske og kjemiske analyser bringer dette verdifull viten om levekår, miljøfaktorer, kosthold og dødsårsaker (2). Sammenliknende studier av DNA hos folk i ulike deler av verden gir nyttige bidrag til vår viten om migrasjon og folkevandringer. Antropologer, arkeologer og patologer har etter hvert fått et metodemessig fellesskap som gjør det naturlig å sette slike undersøkelser inn i et samlet tidsperspektiv (fig 3).

**Hva finnes i patologiarkivene?**

Moderne prepareringsteknikk (fiksering, parafinnstøping, mikrotomskjæring) for lysmikroskopi la grunnlaget for cellulærpatologien som revolusjonerte medisinen i annen del av 1800-tallet. Vevsprøver fiksert i formalin og innstøpt i parafinvoks viste seg å være svært holdbare, og fra rundt 1930 ble

det vanlig å arkivere diagnostisk materiale i Norge. Når det finnes mikroskopiske snitt og vevsblokker fra pasienter som var over 80–90 år i 1930, betyr det at vi besitter materiale fra personer som var født på midten av 1800-tallet. Hvis det ikke har vært for lang avstand mellom generasjonene, vil det i beste fall kunne foreligge vevsmateriale fra opptil 7–8 generasjoner av samme familie.

På landsbasis blir tallene fra norske patologilaboratorier ganske formidable. I år 2000 ble det undersøkt 340 000 vevsprøver og 560 000 cytologiske prøver (7). Dessuten består hver prøve ofte av flere ulike vevsblokker, ikke sjelden flere enn ti, enkelte ganger opptil 50. Samme år ble det utført vel 5 000 obduksjoner, de fleste med uttak av vevsblokker til mikroskopi og arkivering. I forbindelse med at regjeringen nedsatte et utvalg for utredning av biobanker i 2001, ble det gjort en opptelling av den totale arkiverte prøvemengden (1). Ved de 26 patologilaboratoriene i Norge finnes det ca. 20 millioner vevsbiter innstøpt i parafinblokker og et tilsvarende antall mikroskopiske snitt (fig 4). Disse representerer nærmere 5,5 millioner pasienter over en periode på mer enn 70 år (fig 5). I tillegg er det lagret et tilsvarende antall cytologiske prøver fra de siste 40–50 år, slik at vi kommer opp i drøyt 10 millioner pasienter. Blant dem er praktisk talt alle kvinner i Norge over 18 år. Alt dette er rimelig godt arkivert sammen med diagnosekartotek og remisser med beskrivelse av funnene. Prøvene representerer alle tenkelige sykdommer i samtlige organer, alle aldersklasser fra fostre og nyfødte til pasienter oppunder 105 år. I tillegg finnes det normalt vev og celler fra alle organer.

**Nye metoder**

*DNA-ekstraksjon og polymerasekjedereaksjon*

DNA (arvestoff) kan isoleres fra parafin-snitt, og i løpet av det siste tiåret har vi sett ulike molekylærbiologiske metoder anvendt i studier av formalinfikserte vevsbiopsier. Det er verdt å merke seg at varigheten av formalinfikseringen (optimalt 1–3 døgn) før

innstøping i parafinvoks i betydelig grad påvirker DNA-utbyttet (8). Det lar seg også gjøre å fjerne dekkglassene fra fargede snitt og celleutstryk og isolere DNA. Ved fiksering og lagring av vev, og særlig dersom ubufret formalin anvendes, nedbrytes DNA-trådene til kortere bruddstykker. En sammenrast mursteinsbygning kan illustrere disse DNA-stykkene, og arbeidet videre kan sammenliknes med det å bruke de enkelte mursteinene til å identifisere huset. Likevel kan slike DNA-bruddstykker tjene som utgangspunkt for identifikasjon av gener og genetiske avvik med høy spesifisitet. Ikke minst kan genfeil ved arvelige sykdommer og mutasjoner i kreftceller påvises. Oppkopiering (amplifisering) av det aktuelle DNA-området ved hjelp av polymerasekjedereaksjon (PCR) er den vanligste måten å innlede slike studier på (9).

*In situ-hybridisering og in situ-PCR*

In situ-hybridisering har likhetstrekk med immunhistokjemi. En DNA-probe komplementær til det DNA eller RNA man vil studere, anvendes som søkeredskap i stedet for et antistoff. For å oppnå økt sensitivitet kan metoden forfines ved å gjøre en PCR-amplifikasjon av det søkte DNA eller RNA på vevssnittet før selve hybridiseringen, såkalt in situ-PCR (10).

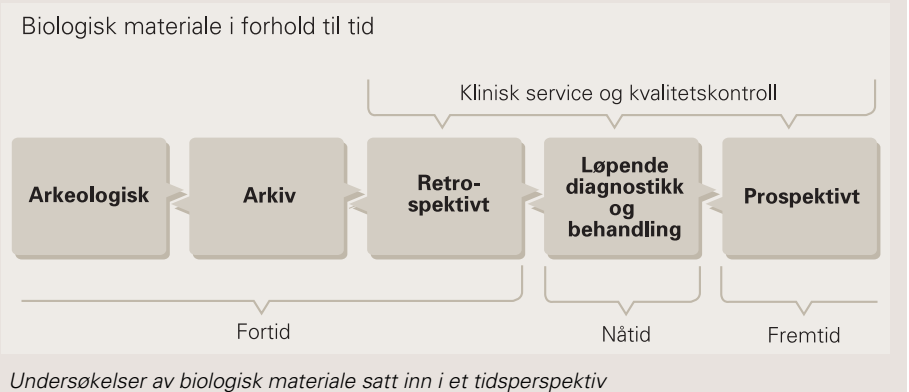
*Kvantitativ PCR*

Dersom innledende studier har gitt holdpunkter for amplifikasjon eller delesjon i et bestemt område av et kromosom, vil man kunne anvende kvantitativ PCR til å analysere enkeltgener i det suspekterte området. Kvantitativ PCR er en videreutvikling av vanlig PCR, konstruert slik at et fluorescerende molekyl frisettes fra produktene av hver ny PCR-syklus (11). Fluorescenssignalet måles ved hver syklus, og intensiteten er proporsjonal med mengden akkumulert PCR-produkt. Dette muliggjør en nøyaktig kvantitering av gendosen eller genekspressjonen i cellene.

*Funksjonelle genstudier*

Den biologiske betydningen av de DNA-endingene som påvises vil ikke alltid være entydig. Vi vet at genaktiviteten ikke er statisk, men varierer mellom ulike celletyper og svinger som følge av fysiologiske og sykdomsrelaterte forhold. Ved funksjonelle genstudier søker man å bestemme uttrykket av de enkelte gener eller genfamilier ved normale og patologiske tilstander. Immunhistokjemiske analyser kan gi informasjon om forekomsten av forskjellige genprodukter. Mer inngående kunnskap om dynamikken i genekspressjonen forutsetter imidlertid at man gansker trinnet før det endelige genproduktet, nemlig mRNA, som er spesifikt for det aktuelle proteinet. RNA er mindre stabilt enn DNA, og dekomponeres på få minutter som følge av RNAs-er, enzymer som finnes mange steder i våre omgivelser. Len-

**Figur 3**



ge antok man derfor at RNA måtte være ødelagt i formalinfiksert, parafinnstøpt arkivmateriale. Imidlertid har det vist seg at en liten fraksjon av delvis intakt RNA og tallrike små stykker kan holde seg over lang tid, og kan utvinnes (12, 13).

#### Immunhistokjemi

Den kontinuerlige utviklingen av nye anti-stoffer, sammen med moderne metoder for avdekking av antigener (proteinasebehandling, mikrobølgebehandling, trykkoking) (14, 15), har gitt oss en lang liste av antistoffer som fungerer godt til immunhistokjemiske analyser av mikroorganismer, proteiner, hormoner og andre biologiske substanser (genprodukter) i formalinfiksert vev. Etter som analysene gjøres under lysmikroskopisk kontroll direkte på vevssnitt, blir spesifiteten høy.

Bruk av såkalte vevsmatriser med nærmere tusen små vevsprøver i en parafinblokk gir mulighet for betydelig effektivisering av analysene (16).

Undersøkelsene er først og fremst kvalitative, men kvantitering kan til en viss grad gjøres. Bruk av automatiserte roboter medfører mulighet for betydelig standardisering.

#### Lasermikrodisseksjon

Høy cellulær spesifisitet kan også oppnås ved anvendelse av lasermikrodisseksjon. Denne teknikken gjør det mulig ved synets ledelse gjennom et mikroskop å dissekere ut cellegrupper eller enkeltceller som er representative for den cellepopulasjonen som skal undersøkes. Cellene overføres så automatisk til et prøverør og kan analyseres videre. Metoden egner seg godt for parafinnstøpt vev (11, 17).

#### Væskestrømscytometri

Væskestrømscytometri er en metode til automatiske sortering og analyse av enkeltceller i suspensjon. Etter deparafinering og proteinasebehandling kan fluorescensfargede celler fra arkivert vev anvendes i slike undersøkelser. Flere parametere kan analyseres parallelt, opptil 120 000 celler per sekund. Analyse av ploiditet i maligne svulster kan ha prognostisk betydning, og gjøres ikke sjelden med cytometriske metoder (18, 19).

#### Bildeanalyse

Med moderne elektronisk bildeanalysestyr kan kvantitative mikroanatomiske målinger (såkalt morfometri) av celler og vev gjøres direkte på parafinsnitt. Et mikroskopmontert videokamera tilkoblet en datamaskin med et egnet analyseprogram behøves. Ved histokjemisk farging av kjernenes kromatin og anvendelse av et kamera som registrerer fargeintensitet kan dette være en alternativ måte å bestemme ploiditet på i en utvalgt cellepopulasjon, for eksempel kreftceller (18).

#### Nye mikroskopiteknikker

I tillegg til ordinær lysmikroskopi kan materiale undersøkes med elektronmikroskopi og flere nyere mikroskopiteknikker. Konfokal laserskanningmikroskopi har vært mye brukt i de siste årene. Prinsippet er at fluorokromfarget vev bestråles med en laserstråle, deretter registreres fluorescenssignalet automatisk fra ett og ett punkt. Signalene databehandles slik at det bygges opp et tredimensjonalt bilde med svært høy oppløsning (20).

#### Ny bruk av gammelt materiale

Plutselig er vi kommet inn i en helt ny verden. På gammelt materiale kan vi identifisere omtrent samtlige av menneskets mer enn 30 000 gener. Vi kan analysere alle typer vev og sykdommer med henblikk på DNA, delvis RNA og på proteiner og andre stoffer, og i tillegg kan vi sammenholde dette med utseendet i celler og vev. Med stor nøyaktighet kan vi identifisere enkeltceller og grupper av celler i vevet og gjøre spesifikke analyser på dem. Vi kan påvise både avvik i kreftceller og forandringer ved infeksjoner, vi kan karakterisere både de normale og de unormale cellene. Det vil trolig være mulig å granske virus i nervevev fra poliomyelittpasienter som døde under epidemien i Norge i 1950-årene, og studere hvilke undergrupper av papillomavirus som forekom i livmorhalskreft i tidligere tider.

Med disse metodene kan vi klassifisere sykdommer i vev trekvart århundre tilbake og stille diagnoser som ingen visste om den gang. Dette fagfeltet er i sin begynnelse, metodene forbedres stadig, og det dukker opp nye diagnostiske og prognostiske muligheter. Dette setter oss også i et dilemma. Mulighetene for spennende helseforskning er store, noe som kan gi kunnskaper av vesentlig betydning for dagens pasienter. Samtidig må vi passe på at vi ikke bruker opp vevs- og cellebankene, da sannsynligheten er stor for at nye og bedre metoder i fremtiden vil gjøre materialet enda mer verdifullt.

#### Hva ville våre oldeforeldre ha sagt ?

Norske patologiarkiver er særlig verdifulle fordi nesten ingenting av materialet er kastet. Dermed gir de oss muligheter for biologiske undersøkelser av store deler av befolkningen som har levd gjennom mange år, noe som kan komme dagens helsearbeid til gode. Likevel er dette et svært følsomt emne, og noen opplysninger kan pasientene gjerne være foruten. Det er ikke så kjekt å finne ut at vår ærverdige oldefar led av fremskreden syfilis, eller at han ikke var far til ett av oldefors barn. Det er heller ikke nødvendigvis et gode å få vite at man bærer i seg anlegg til en sykdom som vil bryte ut om en del år, og så gå år etter år og vente på den med uro.

Reviderte diagnoser kan også være ubehagelige for patologen. Med jevne mellomrom stilles det feil diagnoser, og tidligere, da man ikke hadde de nåværende spesialana-



**Figur 4** Arkivet ved Gades Institutt, Avdeling for Patologi, Haukeland Universitetssykehus. Her finnes ca. to millioner parafinnstøpte biopsier, de eldste fra 1930



**Figur 5** Øverst en parafinblokk med vev fra 1930, nederst en parafinblokk fra 2002

lysene, famlet man ofte i blinde. I en del andre land har det vært problematisk å lagre slikt vevsmateriale. Det kan føre til rettsfølgelse på grunn av feildiagnoser, og problemer fordi pasienter ønsker å få utlevert sitt eget materiale, både for destruksjon og for kommersielle formål. Det har også vært flere åpne juridiske spørsmål forbundet med analyser på arkivert materiale. Derfor forekommer det ved noen laboratorier i andre land, først og fremst i USA, rutinemessig destruksjon av arkivmateriale etter en tidsperiode på ned til noen måneder. Av økonomiske årsaker smelter også mange laboratorier om parafinblokkene for å bruke parafinen om igjen.

Arkivene i norske patologilaboratorier er enestående. Kombinert med like unike befolkningsundersøkelser og epidemiologiske registre gir de oss store muligheter til bedre kvalitetssikring og forskning i helsevesenet. Lovregulering og streng etisk overvåking av biobankene vil også ivareta at bruken av arkivene skjer i betryggende former (1).

#### Litteratur

Komplett litteraturliste finnes i artikkelen på [www.tidsskriftet.no](http://www.tidsskriftet.no)

1. Norges offentlige utredninger. Biobanker. Innhenting, oppbevaring, bruk og destruksjon av humant biologisk materiale. NOU 2001: 19. Oslo: Statens forvaltningstjeneste, Seksjon statens trykning, 2001.
5. Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Paabo S. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 1997; 90: 19–30.
7. Årsrapport 2001. Oslo: Den Norske Patologforening, 2001.
8. Dubeau L, Chandler LA, Gralow JR, Nichols PW, Jones PA. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res* 1986; 46: 2964–9.
9. Wang W, Kumar P, Schwarz M, Malone G, Haworth A, Kumar S. PCR amplification of 40 year-old paraffin-embedded tumor tissues: comparison of four different DNA extraction and purification methods. *Int J Oncol* 1994; 5: 453–7.
10. McNicol AM, Farquharson MA. In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. *J Pathol* 1997; 182: 250–61.
11. Specht K, Richter T, Muller U, Walch A, Werner M, Hofler H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am J Pathol* 2001; 158: 419–29.
12. Krafft AE, Duncan BW, Bijwaard KE, Taubenberger JK, Lichy JH. Optimization of the isolation and amplification of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: the Armed forces institute of pathology experience and literature review. *Mol Diagn* 1997; 2: 217–30.
13. Lewis F, Maughan N, Smith V, Hillan K, Quirke P. Unlocking the archive-gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol* 2001; 195: 66–71.
19. Tropé CG, Abeler V, Bækelandt M, Kærn J. DNA-ploiditet ved epitelial ovarialkreft – en uavhengig prognostisk faktor. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2000; 120: 43–9.